

На правах рукописи

Филипьев Михаил Павлович

**ЭЛЕКТРОННО-КОНФОРМАЦИОННЫЕ МОДЕЛИ
КАЛЬЦИЙ-ВЫСВОБОЖДАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ
КЛЕТОК СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ**

05.13.18 Математическое моделирование, численные методы и
комплексы программ

01.04.07 Физика конденсированного состояния

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Екатеринбург - 2007

Работа выполнена на кафедре вычислительной математики Уральского государственного университета им. А.М. Горького и в лаборатории математической физиологии Института иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской Академии наук.

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук,
доцент Соловьева Ольга Эдуардовна.

Научный консультант:

доктор физико-математических наук,
профессор Москвин Александр Сергеевич.

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук,
профессор Иванов Алексей Олегович.

доктор физико-математических наук
Лукоянов Николай Юрьевич.

Ведущая организация:

Государственное образовательное учреждение
“Уральский государственный технический университет – УПИ”

Защита состоится 16 мая 2007 г. в 15 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета К 212.286.01 по присуждению ученой степени кандидата физико-математических наук при Уральском государственном университете им. А.М. Горького по адресу:

620083, г. Екатеринбург, просп. Ленина, 51, комн. 248.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Уральского государственного университета им. А.М. Горького.

Автореферат разослан "13" апреля 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических
наук, профессор

В.Г. Пименов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Выяснение молекулярно-клеточных механизмов возбуждения и сокращения сердечной мышцы является основой для понимания её функционирования в норме и при патологии. Современные клинические и экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что возникновение ряда хронических заболеваний сердца (например, аритмии или сердечной недостаточности) связано с нарушениями во внутриклеточной динамике кальция. Важнейшим процессом, регулирующим динамику кальция в клетках, является процесс высвобождения кальция из внутриклеточных хранилищ через кальций-высвобождающие (рианодиновые, RyR) каналы (Bers D.M. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force). Молекулярно-клеточные механизмы процесса высвобождения кальция уже более двадцати лет изучаются экспериментально и при помощи математического моделирования, но до сих пор остаются невыясненными (Soeller et al. // Prog Biophys Mol Biol, 2004).

Традиционно функционирование ррианодиновых каналов описывается при помощи марковских цепей с predetermined количеством состояний. При этом вероятности переходов между состояниями цепи определяются из экспериментальных данных (Stern et al. // J Gen Physiol, 1999). Однако такой подход является сугубо феноменологическим и не учитывает физико-химических особенностей строения клетки, особенностей структуры каналов и их энергетики. В рамках существующих моделей не может быть описан широкий спектр явлений, связанных с функционированием RyR-каналов в клетках сердечной мышцы.

В связи с этим разработка новых физически обоснованных математических моделей ррианодиновых каналов и кальций-высвобождающей системы клеток сердечной мышцы в целом является одной из важнейших задач современной математической физиологии сердца.

Цель работы. Основной целью диссертационной работы является разработка биофизически обоснованной электронно-конформационной модели RyR-

каналов и соответствующей теории, позволяющей описать и объяснить основные экспериментально наблюдаемые явления в функционировании RyR-каналов в сердечных клетках.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- разработать математические модели одиночного RyR-канала и группы RyR-каналов в рамках электронно-конформационного подхода, представляющего собой адаптацию известных физических и биофизических подходов, применяющихся для описания структурных (конформационных) изменений в белковых молекулах (Шайтан и др. // Биофизика, 1985) и для описания фотоиндуцированных фазовых переходов в кристаллах (Nagaosa et al. // Phys Rev B, 1989);
- разработать численные схемы и комплекс программ для компьютерного моделирования активности RyR-каналов;
- воспроизвести в рамках построенных моделей основные экспериментальные данные о функционировании RyR-каналов в клетках сердечной мышцы.

Научная новизна результатов

1. Впервые построены биофизически обоснованные модели RyR-каналов, опирающиеся на электронно-конформационный подход для описания структурно-функционального состояния белков.
2. На базе методов численного интегрирования стохастических дифференциальных уравнений и методов моделирования дискретных случайных процессов разработан комплекс численных алгоритмов и компьютерных программ для численных реализаций моделей в средах программирования Delphi и Matlab.
3. В рамках единого биофизического подхода к моделированию RyR-каналов воспроизведены и объяснены основные экспериментальные данные об индивидуальном и коллективном поведении RyR-каналов в клетках сердечной мышцы.

Теоретическая и практическая ценность. Построенные модели и полученные в компьютерных экспериментах результаты моделирования позволяют выяснить и предсказать новые молекулярно-клеточные механизмы регуляции

сократительной функции клеток сердечной мышцы в норме и при патологии. Практическую ценность составляет разработанный комплекс программ, реализующий алгоритмы моделирования стохастических дифференциальных уравнений со случайными переключениями и позволяющий проводить численные эксперименты на модели для различных постановок задачи. Разработанные модели могут быть интегрированы в модель электромеханического сопряжения в сердечных клетках, разрабатываемую в лаборатории математической физиологии Института иммунологии и физиологии УрО РАН и других лабораториях. Полученные результаты могут быть включены в программы специальных курсов для студентов математико-механического и физического факультетов Уральского государственного университета, специализирующихся в области математического моделирования в биологии и медицинской физики, а также студентов, специализирующихся в биофизике.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы докладывались и обсуждались на 48-ом и 50-ом Съездах Американского Биофизического общества (Балтимор, США, 2004; Солт Лейк Сити, США, 2006), XIX Съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Екатеринбург, 2004), XXXV Международном конгрессе по Физиологическим наукам (Сан-Диего, США, 2005), 2-ой Международной конференции по Фотоиндуцированным фазовым переходам (Ренн, Франция, 2005), Российско-британской молодежной конференции «Мышцы: строение, функции, регуляция» (Екатеринбург, 2007), Летней школе ДААД «Моделирование сильно-коррелированных многокомпонентных систем» (Екатеринбург, 2004), 5-ой Всероссийской конференции аспирантов и молодых ученых по математическому моделированию и информационным технологиям (Новосибирск, 2004), 12 Международной конференции «Математика. Компьютер. Образование» (Пущино, 2005), 37-ой региональной молодежной конференции «Проблемы теоретической и прикладной математики» (Екатеринбург, 2006); Первом Российском научном форуме «Демидовские чтения» (Екатеринбург, 2006) и научных семинарах в Институте иммунологии

и физиологии УрО РАН. Исследования, проведенные в рамках диссертационной работы, поддержаны стипендиями Президента РФ и Губернатора Свердловской области, грантами молодых ученых УрО РАН, грантами Министерства образования РФ, РФФИ, the Wellcome Trust и Fogarty International Center.

Публикации. Результаты диссертации опубликованы в 31 работе. Основные публикации по теме диссертации представлены в списке работ [1-22].

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения и списка литературы. Общий объем работы составляет 162 страницы, библиография содержит 123 наименования.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во *введении* обоснована актуальность темы исследований, сформулирована цель диссертационной работы и пути её достижения, отмечена новизна, теоретическое и практическое значение работы.

В *первой главе* дан обзор литературы по теме диссертации, описаны современные представления о механизмах функционирования клеток сердечной мышцы, роли ионов кальция (Ca^{2+}) и процесса высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ в развитии сокращения миокарда; представлены основные подходы к моделированию динамики Ca^{2+} в клетках сердечной мышцы; сформулированы основные положения теории «локального контроля» (Stern M.D. // Biophys J, 1992), описывающей высвобождение Ca^{2+} как пространственно-временное наложение большого количества единичных событий высвобождения Ca^{2+} (Ca^{2+} спарков), происходящих в небольших локальных структурах клетки (высвобождающих единицах, ВЕ, Рис. 1).

В рамках теории локального контроля ключевыми проблемами являются описание активности RyR-каналов, описание завершения локального события высвобождения кальция (Stern et al. // J Gen Physiol, 1999) и др. Попытка решения этих задач и привела к формулировке электронно-конформационной модели RyR-каналов.

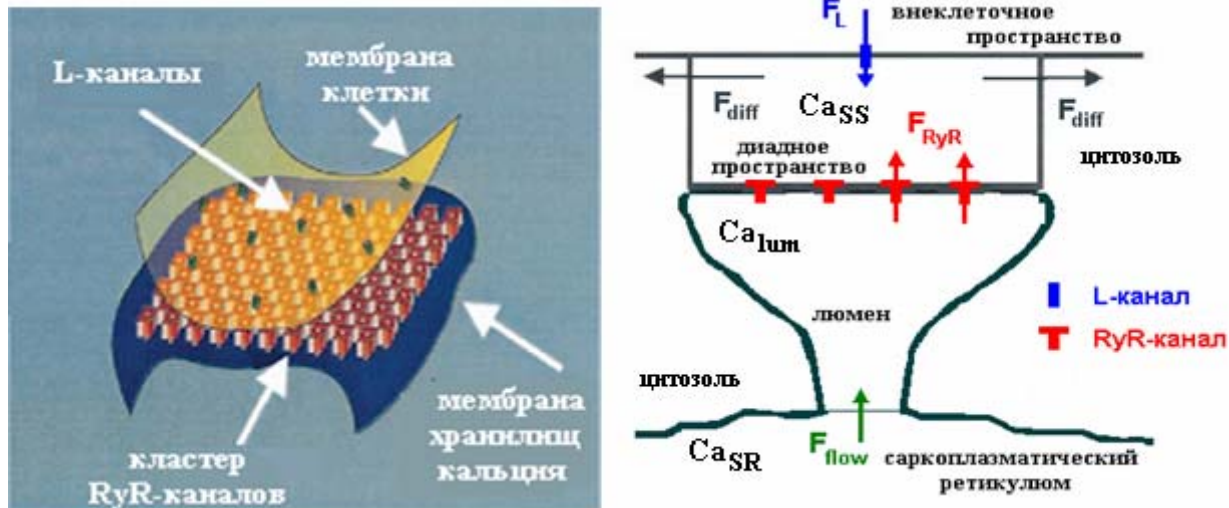


Рис. 1. Высвобождающая единица (ВЕ). Рианодиновые каналы сгруппированы в *кластер* и образуют почти квадратную решетку на мембране единицы внутриклеточных хранилищ кальция – *люмена* саркоплазматического ретикулума (СР). F_i – потоки Ca^{2+} между СР, цитозолем и отделами ВЕ, Ca_i – концентрации Ca^{2+} в отделах ВЕ и СР.

Вторая глава посвящена описанию электронно-конформационной (ЭК) модели одиночного RyR-канала; математической формализации модели в виде системы стохастических дифференциальных уравнений, взаимосвязанных с дискретным случайным процессом; а также построению численных схем для компьютерного моделирования активности RyR-канала.

Построение ЭК-модели одиночного RyR-канала. RyR-канал представляет собой гигантскую белковую молекулу с огромным числом внутренних степеней свободы (Рубцов и др. // Биохимия, 1997). В рамках ЭК-подхода все множество степеней свободы сводится к двум степеням свободы - быстро изменяющейся *электронной* и медленно изменяющейся *конформационной*. Электронная степень свободы при помощи дискретной переменной μ описывает два электронных состояния канала – *закрытое* ($\mu=0$) и *открытое* ($\mu=1$). Конформационная степень свободы при помощи непрерывной координаты Q описывает конформационное (структурное) состояние канала. В простейшей модели изменение координаты Q может быть связано с упругой деформацией канала или пространственным смещением функциональных групп RyR-канала. При этом изменение переменной μ может быть связано с переходами макромолеку-

лы канала (или этих функциональных групп) между некоторым основным закрытым состоянием и возбужденным состоянием, предрасполагающим к открытию канала. Для того чтобы через канал мог течь ионный ток, канал должен находиться в электронно-открытом состоянии ($\mu=1$), а конформационное состояние канала должно позволять ионам Ca^{2+} проходить через его пору (в дальнейшем будем предполагать, что при этом $Q>0$).

Для описания энергии различных состояний RyR-канала мы применяем формализм оператора Гамильтона (оператор энергии, или гамильтониан) (Ландау М.Д., Лившиц Е.М. Теоретическая физика: Т.3). В общем случае гамильтониан одиночного RyR-канала может быть записан в следующем виде:

$$H_S = -h_z s_z - h_x s_x - pQ - aQs_z + \frac{K}{2} Q^2, \quad (1)$$

где $s_z = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{pmatrix}$, $s_x = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{pmatrix}$ - матрицы Паули, применяемые для описания энергетики двухуровневых систем. Первый член гамильтониана (1) описывает разницу энергий двух электронных состояний канала (открытого и закрытого). Второй член описывает эффекты «перемешивания» этих двух состояний. Формально это слагаемое описывает квантовый эффект туннелирования между состояниями, которые могут иметь место в белковых молекулах (Рубин А.Б. Биофизика: Т.2). Третий член в (1) описывает воздействие на канал со стороны обобщенных внешних сил, которые условно можно назвать «эффективным давлением». Четвертый член описывает электронно-конформационные взаимодействия в канале. Последнее слагаемое описывает энергию конформационного состояния канала ($K>0$).

Собственные значения гамильтониана (1) определяют два уровня энергии, формирующие *конформационный потенциал* (КП) RyR-канала, как функцию координаты Q :

$$E(Q, \mu) = \frac{K}{2} Q^2 - pQ + (1 - 2\mu) \frac{1}{2} [(h_z + aQ)^2 + h_x^2]^{\frac{1}{2}}, \quad \mu \in \{0,1\}, \quad (2)$$

$E(Q,0)$ и $E(Q,1)$ определяют две ветви КП, характеризующие энергию электронно-закрытого ($\mu=0$) и электронно-открытого состояний ($\mu=1$). На рисунке 2А изображен характерный вид КП для так называемого *adiaбатического* режима $h_x = 0$. Ветви КП имеют минимумы в точках L и H и пересекаются в точке C. Отметим, что энергия открытых состояний канала описывается точками ветви $E(Q,1)$, находящимися справа от точки C пересечения ветвей (например, точка H). Остальные точки ветвей КП описывают энергию закрытых состояний канала.

Мы предполагаем, что в результате влияния на канал ионов Ca^{2+} электронное состояние канала может быстро изменяться в результате прямого электронного перехода, происходящего без изменения конформационной координаты (так называемые переходы Франка-Кондона, см. вертикальные стрелки на Рис. 2А). При этом энергия канала изменяется скачком, и явление носит выраженный резонансный характер. Вероятность электронных переходов в единицу времени, или интенсивность, описывается формулой Брейта-Вигнера (Ландау М.Д., Лившиц Е.М. Теоретическая физика: Т.3), широко применяемой для опи-

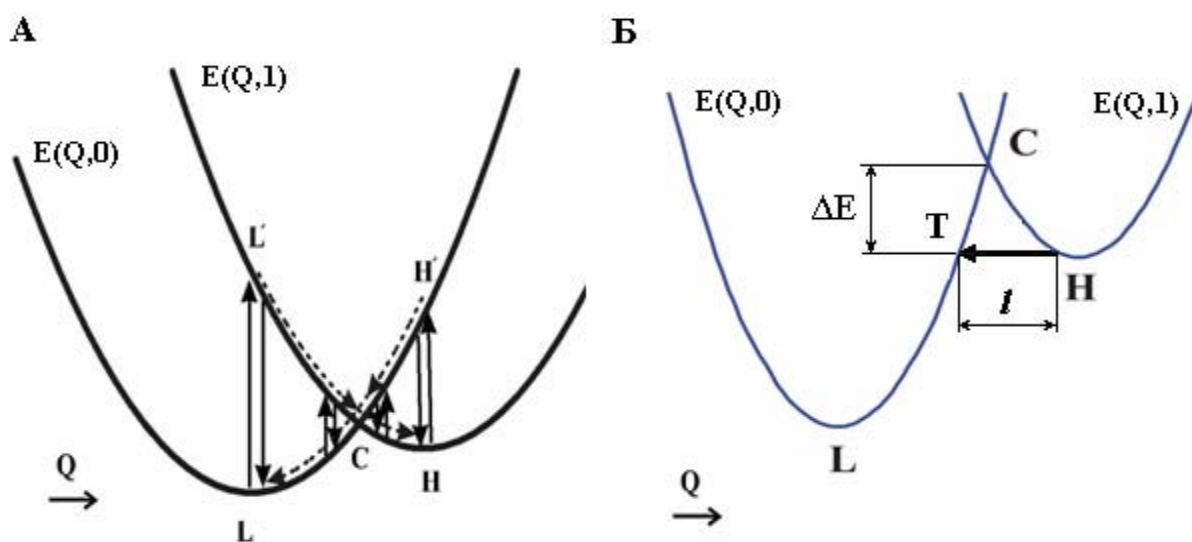


Рис. 2. А. Ветви конформационного потенциала ($K=2$, $a=2$, $p=-0.25$, $h_z=0$, $h_x=0$). Вертикальными стрелками показаны примеры прямых электронных переходов RyR-канала, пунктиром – направления конформационной релаксации. **Б.** Пример туннельного перехода (показан стрелкой). Ветви КП построены при $K=2$, $a=2$, $p=-0.75$, $h_z=0$, $h_x=0$.

сания резонансных переходов:

$$\lambda_{el} = \lambda_{el,max} (cis[Ca]) \frac{E_W^2}{E_W^2 + (E_{stim} - \Delta E(Q))^2}, \quad (3)$$

где $\lambda_{el,max}$ - максимальная интенсивность электронных переходов, зависящая от концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле $cis[Ca]$; $\Delta E(Q) = |E(Q,1) - E(Q,0)|$ - энергия перехода; E_{stim} - энергия ионов Ca^{2+} ; E_W - так называемая полуширина резонанса. Интенсивность электронных переходов будет наибольшей в случае резонанса, когда энергия E_{stim} будет совпадать со значением $\Delta E(Q)$.

Изменение координаты Q описывается уравнением Ланжевена:

$$M \ddot{Q} = - \frac{\partial}{\partial Q} E(Q, \mu) - M \Gamma \dot{Q} - F_{temp}, \quad (4)$$

где M - эффективная масса RyR-канала; Γ - параметр диссипации (конформационное «трение»); F_{temp} - сила случайных «температурных» флуктуаций в конформационной динамике RyR-канала (белый шум).

В рамках ЭК-модели RyR-канала имеется возможность описания квантовых туннельных переходов через энергетический барьер между электронными состояниями с равной энергией (Рис. 2Б). При этом туннелирование описывается как случайный процесс переходов, происходящих с интенсивностью, определяемой по формуле (Ландау М.Д., Лившиц Е.М. Теоретическая физика: Т.3):

$$\lambda_{tun} = \lambda_{tun,max} \exp(-a_{tun} l \sqrt{\Delta E}), \quad (5)$$

где a_{tun} - параметр, ΔE и l - высота и ширина барьера (Рис. 2Б); $\lambda_{tun,max}$ - максимальная интенсивность попыток туннелирования.

Математическая формализация ЭК-модели. Построенная ЭК-модель RyR-канала была математически формализована в виде стохастического дифференциального уравнения Ито:

$$dX = (AX + b(\mu(t))dt + \sigma dW, \quad (6)$$

связанного со случайным процессом $\mu(t) \in \{\mu^{(1)}, \mu^{(2)}\}$ ($\mu^{(1)} = 0$, $\mu^{(2)} = 1$), где

$$X = \begin{bmatrix} Q \\ V \end{bmatrix} \in \mathbb{R}^2, \quad V = \frac{dQ}{dt}, \quad A = \begin{bmatrix} 0 & 1 \\ -\frac{K}{M} & -\Gamma \end{bmatrix}, \quad b(0) = \begin{bmatrix} 0 \\ -\frac{p - a/2}{M} \end{bmatrix}, \quad b(1) = \begin{bmatrix} 0 \\ -\frac{p + a/2}{M} \end{bmatrix},$$

$$\sigma = \begin{bmatrix} 0 \\ \sigma_V \end{bmatrix}, \quad t \geq s, \quad \sigma_V - \text{параметр силы случайных флуктуаций, } W - \text{некоррелиро-}$$

ванный случайный процесс, нормально распределенный для каждого момента времени t с математическим ожиданием, равным нулю, и дисперсией, равной 1.

Начальные условия для системы (6) задают закрытое состояние RyR-канала:

$$Q(0) = Q_L, \quad V(0) = 0, \quad \mu(0) = 0 \quad (7)$$

Случайный процесс $\mu(t)$ представлен в виде цепи с вероятностями переходов:

$$P\{\mu(\tau) = \mu^{(i)}, s \leq \tau \leq t \mid \mu(s) = \mu^{(i)}\} = 1 - (\lambda_{el}(Q(t)) + \lambda_{tun}(Q(t)))(t - s) + o(t - s),$$

$$P\{\mu(t) = \mu^{(j)} \mid \mu(s) = \mu^{(i)} \neq \mu^{(j)}\} = (\lambda_{el}(Q(t)) + \lambda_{tun}(Q(t)))(t - s) + o(t - s). \quad (8)$$

При наличии перехода условные вероятности туннельного и электронного

переходов равны: $P_{tun} = \frac{\lambda_{tun}(Q(t))}{\lambda_{el}(Q(t)) + \lambda_{tun}(Q(t))}$ и $P_{el} = \frac{\lambda_{el}(Q(t))}{\lambda_{el}(Q(t)) + \lambda_{tun}(Q(t))}$, соответст-

венно. При этом мы предполагали, что при обоих типах переходов скорость V не изменяется. При электронных переходах координата Q также остается неизменной, то есть скачка по фазовым координатам Q и V не происходит. В то же время, при туннельном переходе происходит скачок по координате Q , новое значение координаты определяется по формуле:

$$Q_{нов} = \begin{cases} Q_H - \sqrt{Q_H^2 + \frac{2(E(Q, \mu) + h_z)}{K}}, & \mu = 0 \\ Q_L + \sqrt{Q_L^2 + \frac{2(E(Q, \mu) - h_z)}{K}}, & \mu = 1 \end{cases}, \quad (9)$$

где Q_L и Q_H - координаты Q точек L и H конформационного потенциала.

Уравнение (6), процесс (8), условие скачка (9) и начальные данные (7) определяют случайный процесс $\eta(t) = \{X(t), \mu(t)\}$, который называется решением

ЭК-модели. Поскольку уравнение (6) – линейное по X , а функции, задающие интенсивности переходов (3), (5) – ограниченные, то решение существует и единственно (Кушнер Г.Дж. Стохастическая устойчивость и управление).

Для моделирования реализаций процесса $\eta(t)$ были построены численные схемы. Эти схемы комбинируют метод Эйлера-Маруямы (Higham D.J. // SIAM Review, 2001), применяющийся для решения стохастических дифференциальных уравнений, и метод вычисления реализаций дискретных случайных процессов с использованием датчика случайных чисел, а также используют интегральное представление решения уравнения (6).

В *третьей главе* диссертации описаны результаты численных экспериментов на модели *одиночного* RyR-канала; даны биофизическая интерпретация результатов и их сравнение с имеющимися в научной литературе экспериментальными данными, а также проведен параметрический анализ модели.

В рамках численных экспериментов мы исследовали активность одиночного RyR-канала в стационарном режиме в зависимости от постоянной концентрации кальция $cis[Ca]$, определяющей интенсивность электронных переходов ($\lambda_{el,max} \sim cis[Ca]$ в формуле (3)), и имитировали ток ионов Ca^{2+} через канал

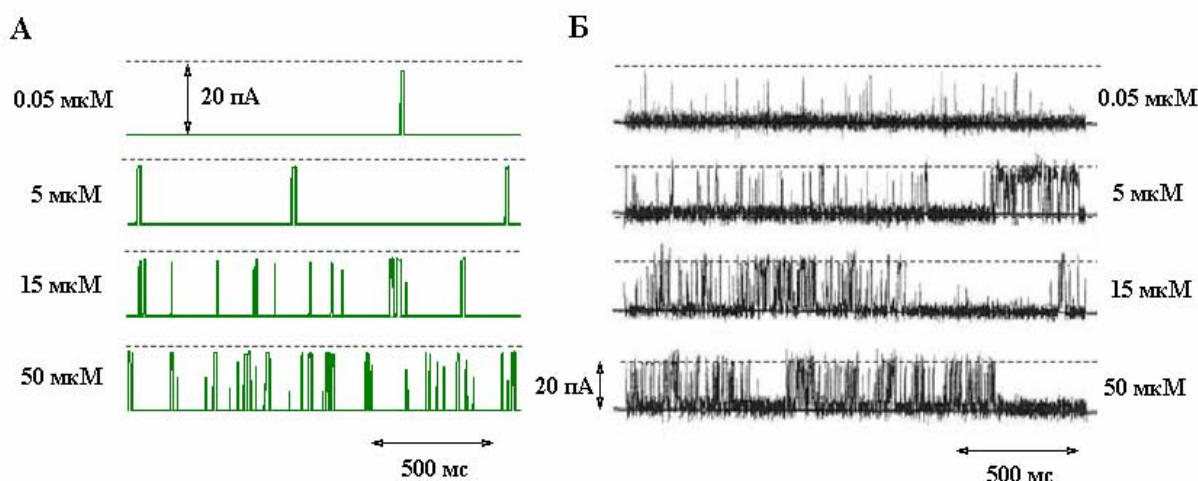


Рис. 3. Реализации кальциевого тока через RyR-канал, полученные в численных экспериментах на ЭК-модели (А) и в экспериментах в липидных бислоях (Б, Zahradnikova et al. *Biophys J*, 1995). На рисунках рядом с реализациями приведены значения концентрации кальция $cis[Ca]$, при которых они получены.

(Рис. 3). Как и в экспериментах на реальном RyR-канале, модель имитировала возрастание активности канала при возрастании $cis[Ca]$ от 0.05 до 50 мкМ.

В результате статистической обработки данных численных экспериментов (для каждого значения $cis[Ca]$ было получено от 500 до 1000 реализаций динамики канала) были построены гистограммы плотностей распределения координаты Q канала в электронно-открытых и электронно-закрытых состояниях (Рис. 4), позволяющие определять вероятности нахождения канала в различных состояниях.

Нами была получена экстремальная зависимость вероятности p_{open} нахождения канала в открытом состоянии от концентрации кальция $cis[Ca]$, хорошо согласующаяся с данными экспериментов на RyR-каналах в липидных бислоях (Рис. 5). При низких концентрациях $cis[Ca]$ (менее 50 мкМ) вероятность p_{open} возрастает с ростом $cis[Ca]$ (явление *активации* каналов), а при высоких (более 50 мкМ) — начинает уменьшаться (явление *инактивации* каналов). При этом обнаружено, что для правильного описания динамики RyR-канала при малых

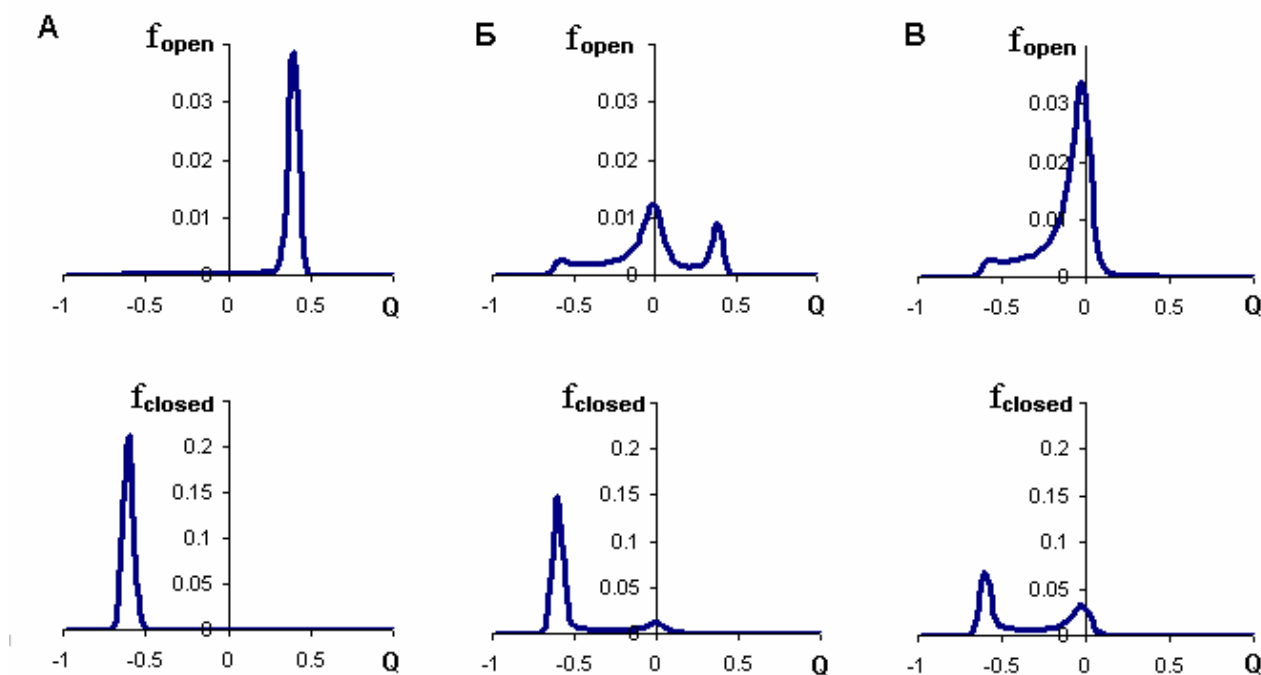


Рис. 4. Гистограммы плотностей распределения конформационной координаты RyR-канала в электронно-открытых (вверху) и электронно-закрытых (внизу) состояниях при различных значениях $cis[Ca]$: 20 мкМ (А), 200 мкМ (Б), 500 мкМ (В).

концентрациях $cis[Ca]$ необходим учет эффектов туннелирования, ограничивающих сверху время нахождения канала в открытом состоянии.

Нами воспроизведено явление возрастания активности RyR-каналов при увеличении концентрации Ca^{2+} во внутриклеточных хранилищах (Ca_{SR} , см. Рис. 1). Влияние концентрации Ca_{SR} на RyR-канал в модели было связано с параметром «эффективного давления» $p = p(Ca_{SR})$, рост которого приводит к понижению потенциальной энергии открытых состояний (в частности, состояния Н; см. Рис. 2А и 2Б для различных значений p) и, как следствие, к росту вероятности нахождения канала в открытых состояниях.

Нами воспроизведены экспериментально наблюдаемые динамические ответы RyR-канала на кратковременную стимуляцию его током через L-канал (Рис. 6). Для имитации изменений локальной концентрации и энергии ионов Ca^{2+} , происходящих при стимуляции, в модели на короткое время (0.5 мс) задавались ступенчатое изменение концентрации $cis[Ca]$ от низкого уровня покоя до различных более высоких уровней и изменение энергии E_{stim} от энергии покоя до энергии возбуждения. В результате наблюдалось адекватное экспериментальным данным изменение во времени величины p_{open} в ответ на стимуляцию (Рис. 6). При этом амплитуда и длительность изменения p_{open} градуально увеличивались с увеличением амплитуды стимула.

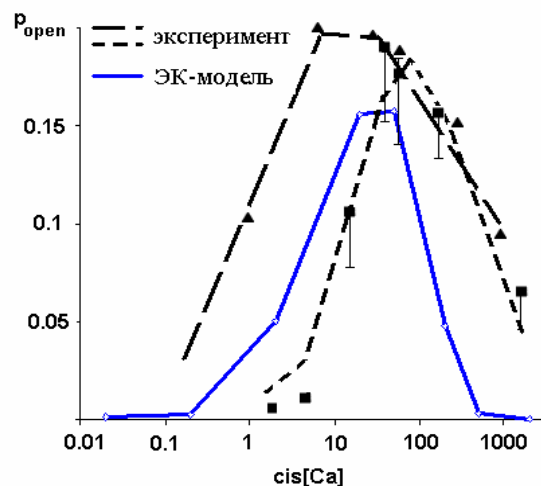


Рис. 5. Зависимость вероятности p_{open} нахождения RyR-канала в открытом состоянии от концентрации $cis[Ca]$ (мкМ). Пунктирными линиями изображены экспериментальные зависимости, полученные при различных условиях экспериментов (Gyorke et al. // *Biophys J*, 1998), сплошной линией - результаты численного моделирования.

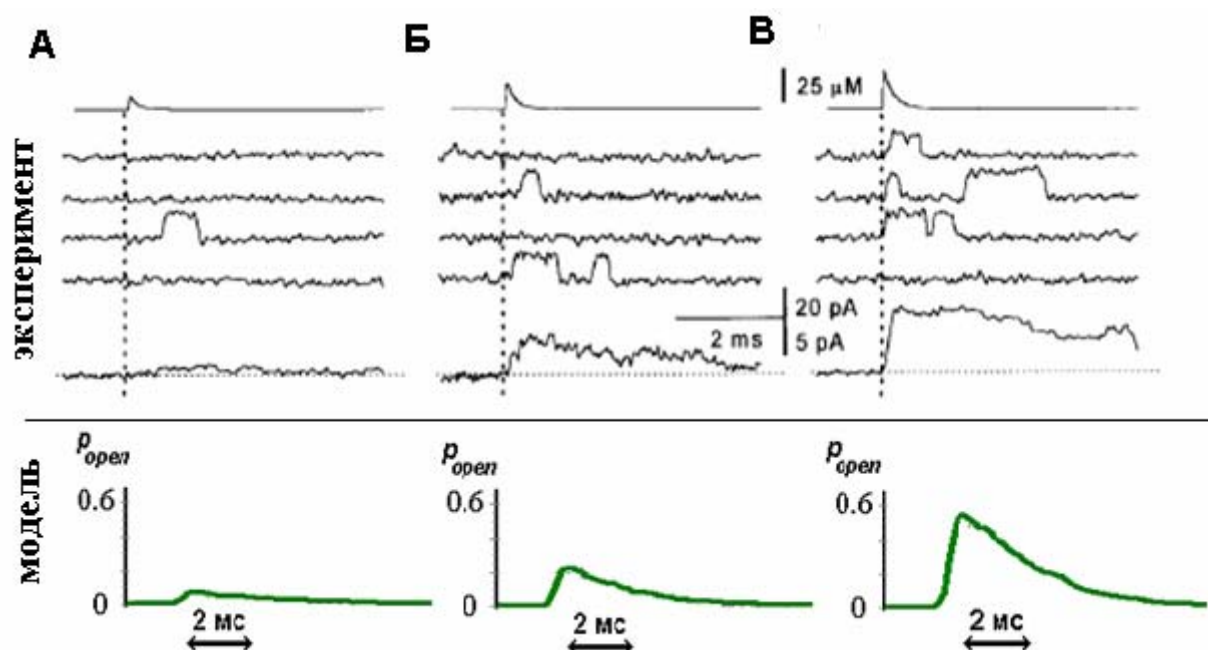


Рис. 6. Градуальный динамический ответ RyR-каналов на кратковременные кальциевые стимулы различной амплитуды. Вверху: экспериментальные данные (Zahradnikova A. et al // *J Gen Physiol.*, 1999). Верхние кривые на панелях **А**, **Б**, **В** отображают кратковременное изменение концентрации $cis[Ca]$ до 1 мкМ, 5 мкМ, 25 мкМ, соответственно. Средние четыре кривые отображают характерные кривые изменения во времени тока через RyR-канал. На нижних кривых изображены кривые изменения во времени среднего тока через RyR-канал. Средний ток через канал пропорционален вероятности p_{open} . Внизу: результаты моделирования. Градуальное изменение во времени вероятности p_{open} , возникающее в ответ на кратковременное изменение концентрации $cis[Ca]$ от 0.1 мкМ до 1, 5 и 25 мкМ (**А**, **Б**, **В**, соответственно) и изменение E_{stim} от 0.05 до 1.25 (энергия возбуждения при $p=-0.25$).

В *четвертой и пятой главах* диссертации ЭК-модель одиночного RyR-канала была развита для описания функционирования групп (решеток) RyR-каналов в стационарных условиях (при постоянных значениях $cis[Ca]$ и Ca_{lum}) и в динамических условиях, реализующихся в высвобождающих единицах при динамически меняющихся концентрациях Ca^{2+} (см. Рис. 1).

ЭК-модель решетки RyR-каналов. Группа RyR-каналов была представлена в виде квадратной решетки 11×11 каналов, каждый из которых описывался ЭК-моделью одиночного RyR-канала (см. систему (6)-(9)). Эффективный гамильтониан для решетки RyR-каналов был записан в виде суммы гамильтонианов отдельных каналов и энергии их конформационных взаимодействий с константой $k \geq 0$:

$$H_{RyR-RyR} = \frac{1}{2} \sum_{m,n} k(Q_m - Q_n)^2, \quad (10)$$

где $m, n \in \{1, \dots, 121\}$ – номера каналов. Конформационные взаимодействия рассматривались в приближении ближайших соседей. Конформационный потенциал для m -го канала в адиабатическом приближении ($h_x \neq 0$) имеет вид:

$$E(Q_m, \mu_m) = \frac{K}{2} Q_m^2 - p Q_m + \frac{2\mu_m - 1}{2} [(h_z + a Q_m)^2 + h_x^2]^{\frac{1}{2}} + \sum_{m,n} k(Q_m - Q_n)^2, \quad (11)$$

где Q_m и $\mu_m \in \{0, 1\}$ – конформационная и электронная координаты m -го канала (Рис. 7). Точки нижней ветви КП, расположенные правее точки С, описывают открытые состояния, остальные точки соответствуют закрытым состояниям.

Динамика электронной степени свободы каналов в модели решетки была упрощена: электронные и туннельные переходы для всех каналов решетки, кроме центрального, были запрещены ($\mu_m \equiv 0$, $m \neq 0$); центральный канал ($m = 0$) в ответ на стимуляцию осуществлял электронный переход ($\mu_0(t) = 1$, $0 \leq t \leq t_0$), а некоторое время спустя осуществлялся обратный электронный переход ($\mu_0(t) = 0$, $t > t_0$). Изменение конформационных координат каналов описывалось 121 уравнением Ланжевена (4) с начальными условиями (7).

При помощи модели мы исследовали влияние параметров p и k на поведение решетки RyR-каналов в ответ на стимуляцию центрального канала к открытию. Каждое фиксированное значение параметра p соответствовало некоторому постоянному значению концентрации Ca_{lum} . В результате серии численных экспериментов было выявлено четыре типа пове-

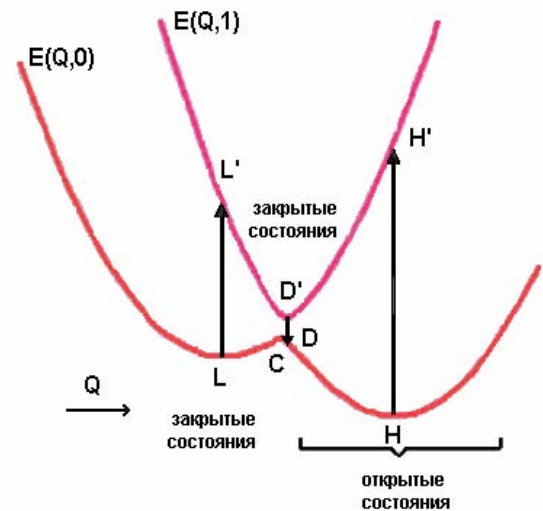


Рис. 7. Ветви конформационного потенциала канала ($h_x \neq 0$). Здесь в отличие от Рис. 2, открытые состояния являются энергетически выгодными ($p=0.3$).

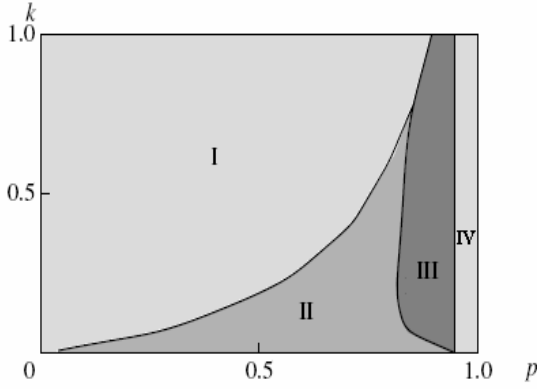


Рис. 8. Бифуркационная (p, k) -диаграмма указывает области значений параметров, соответствующих различным режимам поведения решетки (см. пояснения в тексте).

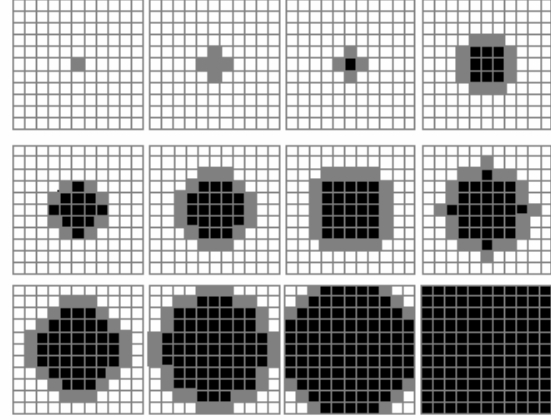


Рис. 9. Эффект домино. Показана динамика открытия каналов в решетке из 121 RyR-канала в последовательные моменты времени (слева направо, сверху вниз). Светлым отображены закрытые каналы, темным - открытые.

дения каналов (Рис. 8): в ответ на стимул каналы не открываются (режим I); открывается только центральный канал (режим II); последовательно «по принципу домино» открываются все каналы решетки (режим III, Рис. 9); одновременно (синхронно) открываются все каналы решетки (режима IV).

Модель высвобождающей единицы (ВЕ). Для описания активности RyR-каналов “*in vivo*”, то есть при динамически меняющихся концентрациях Ca^{2+} , модель решетки была дополнена системой дифференциальных уравнений, описывающей динамику Ca^{2+} в отделах ВЕ (см. Рис. 1) – диадном пространстве (ДП, Ca_{ss}) и в люмене внутриклеточного хранилища (люмене, Ca_{lum}):

$$\begin{cases} \frac{dCa_{ss}}{dt} = \left[1 + \frac{K_{d,B} \cdot B_{tot}}{(K_{d,B} + Ca_{ss})^2} \right]^{-1} (-F_{diff} + F_{RyR}) \\ \frac{dCa_{lum}}{dt} = \left[1 + \frac{K_{d,C} \cdot C_{tot}}{(K_{d,C} + Ca_{lum})^2} \right]^{-1} (F_{flow} - k_{ss/lum} \cdot F_{RyR}) \end{cases}, \quad (12)$$

где B_{tot} , C_{tot} , $K_{d,B}$, $K_{d,C}$ - параметры, описывающие взаимодействие ионов Ca^{2+} с кальций-связывающими буферами; $k_{ss/lum}$ - отношение объема ДП к объему люмена; F_{diff} и F_{flow} - поток ионов Ca^{2+} из ДП в цитозоль и из сети хранилищ кальция в люмен, соответственно; F_{RyR} - поток высвобождения Ca^{2+} че-

рез решетку RyR-каналов, пропорциональный числу открытых каналов, которое зависит от величин Q_m (см. (11)).

Учитывая экспериментальный факт увеличения вероятности открытия RyR-каналов с ростом концентрации Ca^{2+} в люмене, мы предположили, что зависимость параметра эффективного давления p от Ca_{lum} описывается функцией Хилла:

$$p = 2 \cdot \frac{Ca_{lum}^n}{Ca_{lum}^n + K_{Ca}^n} - 1, \quad (13)$$

где K_{Ca} – коэффициент, определяющий чувствительность p к Ca_{lum} ; n – показатель нелинейности этой связи (коэффициент кооперативности Хилла).

При помощи построенной модели мы исследовали влияние концентрации Ca^{2+} (Ca_{SR}) в сети внутриклеточных хранилищ на поведение группы RyR-каналов, возникающее в ответ на стимуляцию центрального канала к открытию. В экспериментах Ca_{SR} предполагалась постоянной и определяла начальное значение Ca_{lum} и величину потока Ca^{2+} (F_{flow}) из сети хранилищ в люмен.

Нами была описана кооперативная динамика сопряженных каналов RyR-решетки в процессе высвобождения Ca^{2+} и воспроизведены события активного высвобождения Ca^{2+} (так называемые « Ca^{2+} спарки»).

При низких значениях $Ca_{SR}=0\div810$ мкМ (и, соответственно, отрицательных или малых положительных значениях параметра p) наблюдалось отсутствие ответа на стимул. При $Ca_{SR}=810\div910$ мкМ наблюдалось кратковременное открытие центрального канала решетки и незначительное высвобождение Ca^{2+} . При типичных для клетки значениях $Ca_{SR}=910\div1150$ мкМ в ответ на стимул наблюдалось согласованное открытие «по принципу домино» небольшой центральной группы каналов, в результате чего начиналось активное высвобождение Ca^{2+} из люмена (Ca^{2+} спарк, Рис. 10), сопровождаемое уменьшением значения Ca_{lum} (и значения параметра p , соответственно). Это приводило к перестройке КП каналов, в результате которой каналы согласованно закрывались

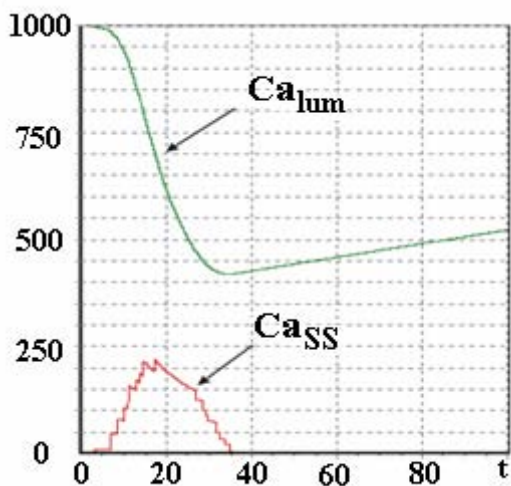


Рис. 10. Кальциевый спарк. Изменение концентраций Ca_{lum} и Ca_{SS} в процессе высвобождения кальция при $Ca_{SR}=1000$ мкМ.

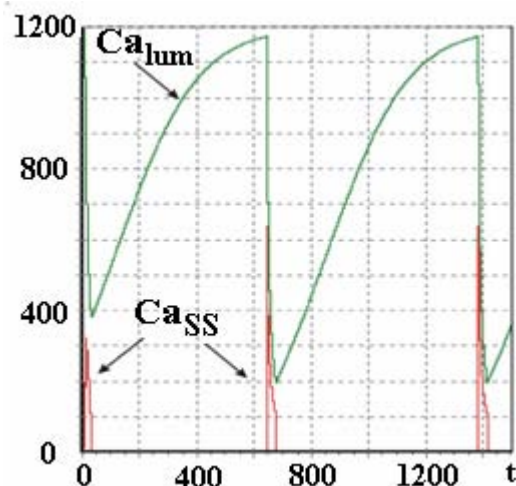


Рис. 11. Авторитмическая активность высвобождающей единицы. Изменение концентраций Ca_{lum} и Ca_{SS} в автоколебательном режиме работы RyR-каналов при $Ca_{SR}=1200$ мкМ.

«по принципу обратного домино», и высвобождение прекращалось. При этом в соответствии с экспериментальными данными (Shannon et al. // Circ Res, 2003.) истощение хранилищ Ca^{2+} было неполным и составляло от 30 до 70% от общего количества Ca^{2+} . Было установлено, что конформационные взаимодействия между каналами являются существенным фактором возникновения согласованного кооперативного открытия каналов и играют важную роль в процессе высвобождения. В частности, при уменьшении значения параметра конформационного взаимодействия k между каналами (см. (11)) в ответ на стимул открывается меньшее количество RyR-каналов решетки, и скорость высвобождения Ca^{2+} оказывается ниже (что может быть фактором снижения силы сокращения сердечной мышцы при некоторых заболеваниях сердца).

При перегрузке внутриклеточных хранилищ кальцием ($Ca_{SR}>1150$ мкМ) в модели возникает режим автоколебаний уровня Ca^{2+} в отделах ВЕ, являющийся следствием перехода в автоколебательный режим работы решетки RyR-каналов без внешней стимуляции, только за счет «движения» RyR-каналов по нижней ветки КП. При больших начальных значениях Ca_{lum} возникает одновременное (синхронное) открытие всех каналов решетки, происходит высвобождение Ca^{2+} , и Ca_{lum} уменьшается. Это приводит к перестройке КП каналов и их син-

хронному закрытию. За счет восполнения люмена кальцием из сети внутриклеточных хранилищ Ca_{lum} начинает возрастать, и каналы вновь открываются и т.д. (Рис. 11).

Нами получена нелинейная зависимость скорости высвобождения Ca^{2+} от загрузки кальцием внутриклеточных хранилищ (Рис. 12). Видно, что наиболее эффективное

высвобождение Ca^{2+} наблюдается при $Ca_{SR}=910\div1150$ мкМ, что соответствует физиологическому режиму функционирования RyR-каналов. В тоже время, при $Ca_{SR}>1150$ мкМ возникает режим автоколебаний, имитирующий возникновение очага авторитмической активности клеток сердечной мышцы, которое может наблюдаться при целом ряде заболеваний сердца. С другой стороны, выявленный автоколебательный режим работы RyR-решетки может быть рабочим режимом функционирования БЕ в специализированных клетках, формирующих ритм сердцебиений, что согласуется с экспериментальными данными (Vinogradova et al. // PNAS, 2005).

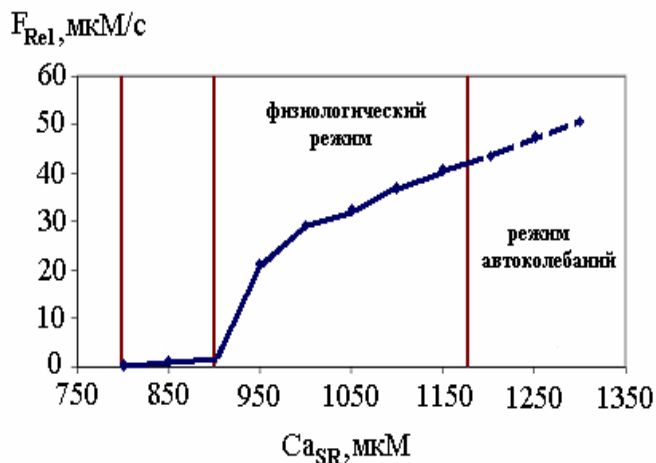


Рис. 12. Зависимость скорости высвобождения кальция в клетке от концентрации Ca_{SR} , полученная по данным модели БЕ.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработаны электронно-конформационные модели одиночного RyR-канала и решетки RyR-каналов. На их основе развита биофизически обоснованная теория, описывающая функционирование RyR-каналов в кальций-высвобождающих единицах сердечных клеток.

2. Для компьютерного моделирования функционирования RyR-каналов разработаны и реализованы в виде программного комплекса численные схемы, комбинирующие методы численного интегрирования стохастических дифференциальных уравнений и методы моделирования дискретных случайных процессов.

3. Впервые в рамках единого биофизически обоснованного электронно-конформационного подхода и численного моделирования воспроизведены и объяснены все основные особенности индивидуального и коллективного поведения RyR-каналов:

- экстремальный характер зависимости вероятности открытия одиночного RyR-канала от концентрации Ca^{2+} в стационарном режиме;
- градуальный динамический ответ RyR-каналов на кратковременную стимуляцию кальцием;
- явление согласованного коллективного (кооперативного) поведения RyR-каналов в решетке. Показана существенная роль конформационных взаимодействий между каналами в процессе высвобождения Ca^{2+} в клетках сердечной мышцы. Выявлены типичные режимы функционирования RyR-решетки и ВЕ.
- существенный нелинейный характер зависимости высвобождения Ca^{2+} от содержания кальция во внутриклеточных хранилищах.

4. Впервые в рамках электронно-конформационной модели обнаружен автоколебательный режим работы RyR-каналов и соответствующих ему автоколебаний концентрации кальция в сердечных клетках. Этот результат объясняет природу нарушений ритма, связанных с патологической авторитмической активностью клеток сердечной мышцы при перегрузке кальцием. С другой стороны, наличие автоколебательного режима функционирования RyR-каналов предсказывает их возможную роль в формировании авторитмической активности клеток водителей ритма в норме.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях

1. Москвин А.С. Электронно-конформационная модель нелинейной динамики решетки рианодиновых каналов в сердечной клетке / А.С. Москвин, М.П. Филиппев, О.Э. Соловьева, В.С. Мархасин // Доклады академии наук, 2005. - Т.400, №2. - С. 269-275

2. Москвин А.С. Кластер рианодиновых каналов в кардиомиоците: динамическая электронно-упругая модель / А.С. Москвин, М.П. Филиппев, О.Э. Со-

Соловьева, В.С. Мархасин // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2004. - Т.90, №8, ч.1. - С. 462

Статьи в ведущих зарубежных научных журналах и изданиях

3. Moskvina A.S. Electron-conformational model of RyR lattice dynamics / A.S. Moskvina, M.P. Philipiev, O.E. Solovyova, P. Kohl, V.S. Markhasin // Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2006. - Vol. 90. - P. 88-103

4. Moskvina A.S. Electron-conformational model of cooperative cardiac ryanodine receptors gating / A.S. Moskvina, M.P. Philipiev, O.E. Solovyova, P. Kohl, V.S. Markhasin // FASEB Journal, 2005. - Vol.19, № 4. - P. A560

5. Moskvina A.S. Pseudo-spin kinetic Ising model of cardiac calcium-induced calcium release (CICR) / A.S. Moskvina, M.P. Philipiev, O.E. Solovyova, V.S. Markhasin // Biophysical Journal, 2004. - Vol. 86, № 1. - P. 62a

6. Philipiev M.P. A mathematical model of SR Ca^{2+} release in cardiac cell based on the theory of local control / M.P. Philipiev, O.E. Solovyova, V.S. Markhasin // Biophysical Journal, 2004. - Vol. 86, № 1. - P. 62-63a.

Статьи в сборниках и материалах конференций

7. Филиппев М.П. Математическое моделирование активности рианодинных каналов в клетках сердечной мышцы // Проблемы теоретической и прикладной математики: Труды 37-й Региональной молодежной конференции. Екатеринбург, 2006. - С. 281-285

8. Филиппев М.П. Математическая модель активности кальций-высвобождающих каналов в клетках сердечной мышцы / М.П. Филиппев, А.С. Москвин, О.Э. Соловьева, В.С. Мархасин // Труды Средневолжского математического общества, 2006. - Т.8, №2. - С. 195-202

9. Moskvina A.S. Electron-conformational theory of cardiac calcium release channel gating / A.S. Moskvina, M.P. Philipiev, O.E. Solovyova, P. Kohl, V.S. Markhasin // "Математическая биология и биоинформатика": I Международная конференция. Доклады. - Пушкино, 2006 г. - С.65-66

10. Москвин А.С. Электронно-конформационный подход к моделированию рианодинных каналов модель / А.С. Москвин, М.П. Филиппев, О.Э. Соловьева, В.С. Мархасин // Бюллетень сибирской медицины. 2005. - Т.4. Приложение 1 (Тезисы докладов V Сибирского съезда физиологов). - С. 18

11. Moskvina A.S. Biophysical adaptation of the theory of photo-induced phase transition: model of cooperative gating of cardiac ryanodine receptors / A.S. Moskvina, M.P. Philipiev, O.E. Solovyova, V.S. Markhasin // Journal of Physics: Conference Series. 2005. - Vol. 21. - P. 195-200

Тезисы докладов

12. Moskvina A.S. Electron-conformational theory of Ryanodine channel gating / A.S. Moskvina, M.P. Philipiev, O.E. Solovyova, P. Kohl, V.S. Markhasin // International symposium "Biological motility: basic research and practice". - Pushino, 2006. -P. 53-54

13. Moskvina A.S. Electron-conformational model of cooperative cardiac ryanodine receptors gating / A.S. Moskvina, M.P. Philipiev, O.E. Solovyova, P. Kohl, V.S. Markhasin // 2nd International conference on "Photo-induced phase transitions: cooperative, non-linear and functional properties". Rennes, France, 2005. – P. 89

14. Москвин А.С. Моделирование кооперативной динамики кальций-высвобождающих каналов в сердечных клетках / А.С. Москвин, М.П. Филиппьев, О.Э. Соловьева, В.С. Мархасин // V всероссийская конференция молодых ученых по математическому моделированию и информационным технологиям: тезисы докладов. - Новосибирск, 2004. - С.33

15. Москвин А.С. Электронно-упругая модель нелинейной динамики решетки рианодинных (RyR) каналов в сердечной мышце клеток / А.С. Москвин, М.П. Филиппьев, О.Э. Соловьева, В.С. Мархасин // XXX Международная зимняя школа физиков-теоретиков "Коуровка-2004", тезисы докладов. – Екатеринбург, 2004. – С.192-Д

16. Филиппьев М.П., Москвин А.С., Соловьева О.Э., Мархасин В.С. Электронно-конформационный подход к моделированию кальций-высвобождающих каналов в сердечных клетках // Демидовские чтения на Урале. Первый Российский научный форум. Тезисы. - Екатеринбург, 2006. - С. 295-296

17. Филиппьев М.П. Математическая модель локального контроля высвобождения кальция в сердечных клетках / М.П. Филиппьев, О.Э. Соловьева, В.С. Мархасин // Сборник тезисов 11 Международной конференции "Математика. Компьютер. Образование" - Ижевск, 2004. – С. 235

18. Москвин А.С. Модель кластера рианодинных каналов в кардиомиоците / А.С. Москвин, М.П. Филиппьев, О.Э. Соловьева, В.С. Мархасин // Сборник тезисов 12 Международной конференции "Математика. Компьютер. Образование". - Ижевск, 2005. - С. 199

19. Филиппьев М.П. Электронно-конформационные модели рианодинных каналов в кардиомиоците / М.П. Филиппьев, А.С. Москвин, О.Э. Соловьева, В.С. Мархасин // Сборник тезисов 13 Международной конференции "Математика. Компьютер. Образование", - Ижевск, 2006. - С. 223

20. Филиппьев М.П. Стохастическая гибридная модель Ca^{2+} -высвобождающего канала в сердечных клетках / М.П. Филиппьев, А.С. Москвин, О.Э. Соловьева, В.С. Мархасин // 9-ый Всероссийский семинар «Моделирование неравновесных систем», Красноярск, 2006, С. 182

21. Филиппьев М.П. Стохастическая математическая модель локального контроля динамики кальция в сердечных клетках // Тезисы VIII Областного конкурса студенческих научно-исследовательских работ по естественным наукам. - Екатеринбург, 2004. – С.16-18

22. Филиппьев М.П. Электронно-конформационные модели высвобождения кальция в сердечных клетках // Всероссийский конкурс среди учащейся молодежи высших учебных заведений РФ на лучшие научные работы по естественным наукам: Тезисы научных работ. - Саратов, 2004. – С. 65-66

Филиппьев Михаил Павлович

**Электронно-конформационные модели
кальций-высвобождающей системы клеток сердечной мышцы**

Автореферат

Подписано в печать 12.04.2007 г. Формат 60х84 1/16
Бумага типографская. Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз.
Заказ № 75. Печать офсетная. 620083, Екатеринбург,
К-83, при Ленина, 51. Типолаборатория УрГУ